

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-196280  
 (43)Date of publication of application : 06.08.1996

C12N 15/09

C12N 1/21

C12P 13/06

// C12N 9/24

(C12N 1/21

C12R 1:15 )

(51)Int.Cl.

(21)Application number : 07-012361  
 (22)Date of filing : 30.01.1995

(71)Applicant :

AJINOMOTO CO INC

(72)Inventor :

SUGIMOTO MASAKAZU  
 OTONA KIYOKO  
 NAGASE KAZUO  
 TSUCHIYA MAKOTO  
 MATSUI YUTAKA  
 YOSHIHARA YASUHIKO  
 NAKAMATSU WATARU

## (54) SUCROSE GENE ORIGINATED FROM CORYNEFORM BACTERIUM AND ITS UTILIZATION

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject gene capable of increasing the sucrose-utilizing ability of a Coryneform bacterium and useful for obtaining an L-amino acid or nucleic acid in a good yield in a short time from raw materials containing the sucrose.

CONSTITUTION: This gene is originated from a Coryneform bacterium and codes a protein which has the amino acid sequence of the formula and which has a sucrase activity. The gene is obtained by a method described in Japanese unexamined patent HEI 5-244958, comprising producing a gene library from the chromosome DNA of the Coryneform bacterium, subjecting the gene library to a colony hybridization with a probe synthesized under the homology in the base sequence of the sucrase gene, selecting a sucrase activity-expressing colony as a sucrase gene-introducing strain from hybridized colonies, and subsequently obtaining a DNA fragment containing the sucrase gene from the cell of the strain.

Val His Thr Glu Lys Ser Ser Lys Arg  
 Pro Ala Thr His Val Cys Pro  
 1 10  
 9 19  
 Pro Glu Glu Arg Lys Asn Asp Pro Asp  
 Cys Met Thr Val Asp Glu Asp  
 20 29  
 30 39  
 Cys Asp Asn Arg Val Ala Glu Val Lys  
 Glu Glu Lys Val Thr Ala  
 385 390  
 395 400  
 Asp Asn Asp Thr Ala Thr Glu Thr  
 Ala Glu Asp Glu Glu Val Ser  
 405 410  
 415 420  
 Pro Ala Asp Pro Glu Lys Glu Asp  
 425

## LEGAL STATUS

17.09.2001

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-196280

(43) 公開日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl. C 12 N 15/09 1/21 C 12 P 13/06 // C 12 N 9/24	識別記号 ZNA	府内整理番号 8828-4B	F I	技術表示箇所 ZNA A 審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全15頁) 最終頁に統く
9162-4B C 12 N 15/00				

(21) 出願番号 特願平7-12361

(22) 出願日 平成7年(1995)1月30日

(71) 出願人 000000066  
味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 杉本 雅一  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 乙名 聖子  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 長瀬 和男  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

最終頁に統く

(54) 【発明の名称】 コリネホルム細菌由来のシュクラーゼ遺伝子とその利用

(57) 【要約】

【構成】 コリネホルム細菌に由来し、シュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターを連結して得られる組換えDNAを、L-アミノ酸又は核酸生産能を有するコリネホルム細菌に導入し、該細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中に生成蓄積したL-アミノ酸又は核酸を採取する。

【効果】 本発明の方法によれば、シュクロース系原料から短時間に効率的にL-アミノ酸又は核酸を製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネホルム細菌由来で、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項2】 配列表配列番号1に記載の塩基配列の2338番目から3609番目に至る塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結されて得られる組換えDNA。

【請求項4】 請求項3記載の組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌。

【請求項5】 請求項4記載のコリネホルム細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中にL-アミノ酸又は核酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-アミノ酸又は核酸の製造方法。

【請求項6】 L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-プロリンより成る群、核酸が5'-イノシン、5'-イノシン酸、5'-グアノシン、5'-グアニル酸より成る群から選ばれる、請求項5記載のL-アミノ酸又は核酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、L-アミノ酸発酵や核酸発酵に用いられるコリネホルム細菌に由来するシュクラーゼ遺伝子、該遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結して得られる組換えDNA、該組換えDNAを保有するコリネホルム細菌、及び該細菌を培養することによるL-アミノ酸又は核酸の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来技術】 遺伝子操作技術を用いたL-アミノ酸生産菌の育種については従来より多くの研究がなされており、報告例も多数ある (Biotechnology Letters, Vol. 2, pp. 525-530 (1980)、Appl. Environ. Microbiol., Vol. 31, pp. 181-190 (1979)、日本農芸化学会昭和56年度大会講演要旨集, p. 8 (1981)など)。しかしながら、これらはいずれもL-アミノ酸合成系の遺伝子を増強することによって目的とするL-アミノ酸の菌体あたりの生産性を高めるものであって、発酵原料である糖の資化性を高めることによって生産効率を高めるものではなかった。

【0003】 一方、遺伝子操作技術を用いてL-アミノ酸生産菌の糖の資化性を変化させた報告としては、エシエリヒア・コリにシュクロース資化能を与えた例がある (特開昭61-119186号及び特開平2-171178号公報参照)。すなわち、シュクロースを取り込み、それをグル

コース-6-リン酸とフラクトースに分解する活性をエシエリヒア・コリに与え、本来エシエリヒア・コリが資化できないシュクロースを炭素源としてできるようにしたものである。また、各種L-アミノ酸生産菌として有用なコリネホルム細菌については、特開平5-244958号において、シュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含む11.6 Kbpの大きさのDNA断片を取得したことが記載されているが、コリネホルム細菌内での当該遺伝子の発現については確認されておらず、シュクロースを原料とするL-アミノ酸や核酸の生産における当該遺伝子の増幅の効果は明らかでなかった。

## 【0004】

【本発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネホルム細菌のシュクロースを資化する能力を増強することによりシュクロースを含む原料から短時間に効率よくL-アミノ酸又は核酸を製造する方法を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、コリネホルム細菌由来のシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子の構造を明らかにし、当該遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターとの組換えDNAを取得し、L-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌に該組換えDNAを導入したところ、当該細菌がシュクロースを含む原料から従来より短い時間で収率良くL-アミノ酸又は核酸を生産できることを見いだし、本発明を完成するに至った。

【0006】 即ち、本発明は、(1) コリネホルム細菌由来で、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子、(2) 配列表配列番号1に記載の塩基配列の2338番目から3609番目に至る塩基配列を有する上記(1)記載の遺伝子、(3) 上記(1)又は(2)に記載の遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結されて得られる組換えDNA、(4) 上記(3)記載の組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌、及び、(5) 上記(4)記載のコリネホルム細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中にL-アミノ酸又は核酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-アミノ酸又は核酸の製造方法、を提供するものである。

【0007】 本発明にいうコリネホルム細菌とは、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p. 599 (1974)に記載されているように、好気性のグラム陽性桿菌であり、従来よりコリネバクテリウム属に分類されている細菌、従来プレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、及びコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレビ

バクテリウム属細菌やミクロバクテリウム属細菌を含むものであり、一般にL-グルタミン酸生産菌として知らわれている下記のような微生物である。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム  
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム  
コリネバクテリウム・カルナエ  
コリネバクテリウム・グルタミカム  
コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・  
グルタミカム)  
コリネバクテリウム・メラセコーラ  
プレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリ  
ウム・グルタミカム)  
プレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・  
グルタミカム)  
プレビバクテリウム・インマリオフィラム  
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバ  
クテリウム・グルタミカム)  
プレビバクテリウム・ロゼウム  
プレビバクテリウム・サッカロリティカム  
プレビバクテリウム・チオゲニタリス  
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム  
【0008】具体的に例示すると、下記のようなL-ア  
ルタミン酸生産性の野生株及びその変異株、並びにこれ  
らから誘導されるL-アミノ酸又は核酸生産株が挙げら  
れる。  
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC1387  
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806  
コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991  
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020  
コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム  
グルタミカム) ATCC15990  
コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965  
プレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテ  
ウム・グルタミカム) ATCC14020  
プレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム  
グルタミカム) ATCC14067  
プレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC1406  
プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネ  
クテリウム・グルタミカム) ATCC13869  
プレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825  
プレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC1406  
プレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240  
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC153  
【0009】本発明においてシュクラーゼ活性を持  
白質をコードする遺伝子とは、シュクロースを加水  
レグルコースとフラクトースを生成する活性を持つ  
質をコードする遺伝子を指す。シュクラーゼ活性は  
がシュクロースを炭素源として利用する時に重要で  
る。シュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺  
伝子を取得するには、特開平5-244958号公報記載の方

り、まず、コリネホルム細菌の染色体DNAより遺伝子ライブラリーを作成し、次いで他の微生物について公知となっているシュクラーゼ遺伝子の塩基配列における相同性をもとに合成したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするコロニーのうちシュクラーゼ活性を発現するものをシュクラーゼ遺伝子導入株として選び出し、当該株の菌体からシュクラーゼ遺伝子を含むDNA断片として取得すればよい。

【0010】本発明において、シュクランゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を連結するベクターとしては、コリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なものであれば特に制限はないが、通常コリネホルム細菌由来のプラスミドを用いればよい。具体的には、pH M1519 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48, pp. 2901-2903 (1984))、pAM330 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48, pp. 2901-2903 (1984))、及びこれらをベースとした薬剤耐性プラスミド等である。また、相同組換えやインサーションシーケンスを用いて上記遺伝子を染色体中に導入することも可能である。相同組換えについては、温度感受性複製起点を用いたコリネホルム細菌の染色体遺伝子組換え法があり (特開平5-7491号公報参照)、また、コリネホルム細菌由来のインサーションシーケンスとしては、IS714、IS719、IS903等があり、これらを利用すればよい (W093/18151号公報参照)。

〔0011〕シュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌は、L-アミノ酸または核酸生産能を有する株を宿主菌とし、これに当該組換えDNAを導入することにより取得することができる。宿主菌として使用できるコリネホルム細菌の具体例としては、例えばL-グルタミン酸生産菌の野生株及びその変異株、並びにL-グルタミン酸生産菌より誘導される各種L-アミノ酸生産株又は核酸生産株が挙げられる。L-グルタミン酸以外のL-アミノ酸としては、L-リジン、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-オニン、L-アスパラギン酸、L-アルギニン、L-プロリン等コリネホルム細菌が生産可能なL-アミノ酸ならいざれどよい。また、核酸としては5'-イノシン、5'-イノシン酸、5'-グアノシン、5'-グアニル酸等が挙げられる。

〔0012〕以下、各L-アミノ酸及び核酸の生産に好適な宿主の具体例を示す。

(1) レーグルタミン酸製造に好適な宿主  
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870  
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806  
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991  
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020  
 コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・  
 グルタミカム) ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965  
 ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020  
 ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067  
 ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869  
 ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825  
 ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066  
 ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240  
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354  
 上記の野生株に加えて、これらから誘導された下記のような変異株も宿主として使用できる。  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12475  
 (FERM BP-2922) (特開平3-49690号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12476  
 (FERM BP-2923) (特開平3-49690号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ12477 (FERM BP-2924) (特開平3-49690号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12478 (FERM BP-2925) (特開平3-49690号)  
 【0013】(2) L-リジン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12031  
 (FERM BP-277) (特開昭60-62994号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ39134  
 (FERM BP-2923) (特開昭60-62994号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3463 (FERM P-1987) (特公昭51-34477号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11082  
 (NRRL B-11470, FERM P-3840) (特公昭59-4993号)  
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム AJ11094 (NRRL B-11472, FERM P-3856) (特公昭59-4993号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12435  
 (FERM BP-2294) (特開平6-7182号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12592  
 (FERM BP-3239) (特開平6-7182号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12593  
 (FERM BP-3240) (特開平6-7182号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12596 (FERM BP-3242) (特開平6-7182号)  
 【0014】(3) L-スレオニン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11188  
 (FERM P-4190) (特開昭60-87788号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11682 (FERM BP-118) (特公平2-31956号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ11683 (FERM BP-119) (特公平2-31956号)  
 【0015】(4) L-アスパラギン酸製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ3859 (FERM P-2799)

(特開昭51-61689号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3860 (FERM P-2800) (特開昭51-61689号)  
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ3877 (FERM P-2803) (特開昭51-61689号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3876 (FERM P-2802) (特開昭51-61689号)  
 【0016】(5) L-イソロイシン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12404 (FERM P-10141) (特開平2-42988号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ12405 (FERM P-10142) (特開平2-42988号)  
 【0017】(6) L-アルギニン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ12144 (FERM P-7642) (特公平5-27388号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12145 (FERM P-7643) (特公平5-27388号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム ATCC21493 (特開平5-3793号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC21659 (特開平5-3793号)  
 【0018】(7) L-プロリン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11225 (FERM P-4390) (特開昭60-87788号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ11512 (FERM P-5332) (特公昭62-36679号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ11513 (FERM P-5333) (特公昭62-36679号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ11514 (FERM P-5334) (特公昭62-36679号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11522 (FERM P-5342) (特公昭62-36679号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11523 (FERM P-5343) (特公昭62-36679号)  
 【0019】(8) L-ヒスチジン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ3420 (FERM BP-2316) (特開平2-186994号)  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ12425 (FERM BP-2212) (特開平2-186994号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12092 (FERM P-7273) (特開平2-186994号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12426 (FERM BP-2213) (特開平2-186994号)  
 【0020】(9) L-バリン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3434 (FERM P-1854) (特開昭63-258588号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12341 (FERM BP-1763) (特開昭63-258588号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3776 (FERM P-2601) (特開昭63-258588号)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12342 (FERM BP-1764) (特開昭63-258588号)  
 【0021】(10) L-ロイシン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3452 (FERM P-1965) (特開昭50-123877号)  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3719 (FERM P-2517) (特開昭50-123877号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3453 (FERM P-1966) (特開昭50-123877号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3455 (FERM P-1968) (特開昭50-123877号)  
 【0022】(11) L-フェニルアラニン製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12637 (FERM BP-4160) (特開平5-49489号)  
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ11761 (FERM P-6286) (特公平2-11235号)  
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12638 (FERM P-12382) (特公平2-11235号)  
 【0023】(12) L-グルタミンの製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・フラバム AJ12418 (FERM BP-2205) (特開平2-186994号)  
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12419 (FERM BP-2206) (特開平2-186994号)  
 【0024】(13) 5'-イノシン酸の製造に好適な宿主  
 ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC6872  
 ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) AJ12192 (FERM P-7949) (特公平5-998号)  
 コリネバクテリウム・エクイ AJ11347 (FERM P-4968) (特公平57-22558号)  
 コリネバクテリウム・エクイ AJ11350 (FERM P-4971) (特公平57-22558号)  
 コリネバクテリウム・エクイ AJ11352 (FERM P-4973) (特公平57-22558号)  
 【0025】(14) 5'-グアニル酸の製造に好適な宿主  
 コリネバクテリウム・エクイ ATCC21280  
 【0026】組換えDNAをコリネホルム細菌に導入する方法には特に制限はないが、通常よく用いられるプロトプラスト法 (Gene, Vol. 39, pp. 281-286 (1985))、電気パルス法 (特開平2-207791号) 等の方法を用いればよい。  
 【0027】かくして得られる組換えDNAを保有するコリネホルム細菌を培養する方法は、従来のL-アミノ酸生産菌又は核酸生産菌の培養方法と特に変わらない。すなわち、培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養

素を含有する通常のものが用いられる。炭素源としては、グルコース、シュクロース及びこれを含有する澱粉加水分解液、糖蜜等の糖類、酢酸等の有機酸類、エタノール等のアルコール類、又はこれらの混合物など、従来コリネホルム細菌の培養に用いられているものが使用できる。しかしながら、本発明の組換えDNAを保有するコリネホルム細菌は、シュクロースからL-アミノ酸又は核酸を生産する能力が顕著に向かっているため、炭素源としてシュクロースを含む培地で培養を行う際に本発明の効果が特に顕著となる。すなわち、ケーンモラセス、ビートモラセス等のシュクロースを含有する原料を使用して発酵を行うと、従来のコリネホルム細菌に比べて目的とするL-アミノ酸又は核酸の生産速度が大いに増大する。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。なお、アミノ酸、ビタミン等の栄養要求性変異株を宿主に使用する場合には、その株が要求する栄養素を培地に適宜加える必要がある。

【0028】培養は、好気的条件下で行うのがよく、培養温度を24~42°C、pHを5~9に制御しつつ、培養液中へのL-アミノ酸又は核酸の生成蓄積が実質的に終了するまで行われる。pHの調整には、無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更には尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス等が使用される。かくして培養を行うことにより培養液中に著量のL-アミノ酸又は核酸が生成蓄積される。蓄積されたL-アミノ酸又は核酸は、晶析、イオン交換樹脂処理等公知の方法を組合せることにより培養液中より適宜採取することができる。

【0029】  
 【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。

【0030】実施例1 (シュクラーゼ遺伝子のブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムへの導入と発現)  
 特開平5-244958号記載の方法により、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を挿入したプラスミドpBS3-43を取得し、更に当該DNA断片をエシエリヒア・コリとコリネホルム細菌のシャトルベクターpSAC4に連結させたプラスミドpSSM30を構築した。pSSM30を保有させたエシエリヒア・コリ JM109の菌体からpSSM30を調製し、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によってブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869を形質転換した。pSSM30を保持するATCC13869株 (以下、ATCC13869/pSSM30と記す) を100mlのCM2G培地 (酵母エキス10g/l、ポリペプトン10g/l、グルコース5g/l、NaCl 5g/l、pH7.0) で培養し、菌体を遠心分離により回収し洗浄後、超音波処理によって破碎し、10万Gの遠心力で分画した上澄を得た。この上澄150μlと0.5Mシュクロース溶液50μlを混合し、30°Cにて30分反応を行った。ついで100°Cで3分間加熱して反応

を停止させ、反応液中に生成したグルコースをグルコースCテストワコーによって定量することによりシュクラーゼ活性を測定した。なお、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869はもともと菌体内にシュクラーゼ活性を持っているため、比較のためpSSM30のベクター部分であるpSAC4のみを保持するATCC13869株 (ATCC13869/pSSM30) についても同様に測定を行った。

【0031】結果を表1に示す。シュクラーゼの活性の単位は、1時間に1mgのグルコースを生成する活性を1 unitとし、粗酵素液中の蛋白質1mgあたりの活性として表示した。表1から明らかなように、pSSM30を導入した株は明らかにシュクラーゼ活性が増強されていることが確認された。

【0032】

【表1】

菌株	シュ克拉ーゼ活性 (units)
ATCC13869/pSSM30	5.7
ATCC13869/pSAC4	0.72

【0033】なお、pSSM30を保有させたエシェリヒア・コリ JM109は、AJ13047と命名され、平成6年9月14日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にプラベスト条

ORF No.	アミノ酸数	相同性のある既知の蛋白質	相同性(%)
F1	388	N-アセチルグルコサミン-6リン酸デアセチラーゼ 由来: エシェリヒア・コリ アミノ酸数: 382	24
F3	307	UDP-N-アセチルムラモイルアラニル-D-グルタミルメゾー-6 デアミノピメリン酸シングセターゼ 由来: パチルス・サチルス アミノ酸数: 494	36
F4	336	ホスホ-N-アセチルムラモイル- ペニタベブチドトランスフェラーゼ 由来: パチルス・サチルス アミノ酸数: 324	39

【0036】実施例3 (シュクラーゼ遺伝子を含むプラスミドのL-リジン生産菌への導入とL-リジン生産への影響)

エシェリヒア・コリ AJ 13047の菌体からプラスミドpSSM30を調製し、L-リジン生産菌であるプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11082 (NRRL B-11470) に電気パルス法を用いて導入した。形質転換体を5 $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート (グルコース5g/l、ポリペプトン10g/l、酵母エキス10g/l、NaCl 5g/l、DL-メチオニン0.2g/l、寒天15g/l、pH7.2) 上にて選択し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をAJ11082/pSSM30と命名した。

【0037】AJ11082及びAJ11082/pSSM30をシュクロースを含む培地にて培養し、L-リジンの発酵生産を行なった。11容ジャーファーメンターに入れた表3に示す組成のリジン生産用培地300mlに各菌株を接種し、培養

約に基づく寄託がなされており、受託番号FERM BP-4800が付与されている。

【0034】実施例2 (シュクラーゼ遺伝子の塩基配列の決定)

pBS3-43に挿入されたDNA断片のうち、約6kbのSma I断片と、それに含まれるシュクラーゼ遺伝子の上流方向に約1kbについて、蛍光標識法により塩基配列を決定した。この配列を配列表配列番号1に示す。本配列にはオーブン・リーディング・フレームが4個存在しているが (ORF-F1: 342~1505、ORF-F2: 2338~3609、ORF-F3: 4438~5358、ORF-F4: 5570~6577)、既知のシュクラーゼ遺伝子との相同性比較により、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムのシュクラーゼの構造遺伝子は、配列番号1の2338番目から3609番目直至塩基配列から成るORF-F2であり、424個のアミノ酸残基から成る蛋白質をコードするものと推定された。また、ORF-F1、ORF-F3及びORF-F4について蛋白質のデータベースNBRFにより相同性検索を行ったところ、表2に示す結果を得た。ORF-F3とORF-F4については既知の蛋白質と高い相同性が見いだされ、それらの間に関係があると考えられる。

【0035】

【表2】

温度31.5°CでアンモニアガスにてpHを7.0に調整しつつ通気攪拌培養を行なった。初発に加えたシュクロースを消費し尽くした後は、培養液中のシュークロース濃度が1~3g/dlの範囲にコントロールされるように別に殺菌した60g/dlのシュクロースと8g/dlの硫酸アンモニウムの混合溶液を連続的にフィードし、フィード液150mlを消費し終わるまで培養を行なった。培養時間とL-リジン蓄積量、及び培養終了後の菌体より常法に従って調製した粗酵素液のシュクラーゼ活性を測定した結果を表4に示す。シュクラーゼ遺伝子の導入により、シュクロースからのL-リジンの発酵生産速度が大幅に向上了。また、遺伝子導入株では菌体内のシュクラーゼ活性が増強されていることが確認された。

【0038】

【表3】

成 分	濃 度
シュクロース	100 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	55 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g/l
大豆蛋白酸加水分解物	50 ml/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
ニコチン酸アミド	5 mg/l

【0039】

【表4】

菌 株	培養時間 (hr)	L-リジン蓄積 (g/dl)	シュ克拉ーゼ活性 (units)
AJ11082	65	9.5	0.35
AJ11082/pSSM30	34	9.4	3.54

【0040】実施例4 (シュクラーゼ遺伝子プラスミドのプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株への導入とL-グルタミン酸生産への影響)  
実施例3と同様にして、シュクラーゼ遺伝子を含むプラスミドpSSM30をプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869に導入した。形質転換体を5 μg/mlのクタム ATCC13869に導入した。形質転換体を含むM-CM2Gプレート上にて選択ロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて選択し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をATCCし、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をATCC13869/pSSM30と命名した。

【0041】 ATCC13869及びATCC13869/pSSM30をシュクロースを含む培地にて培養し、L-グルタミン酸の発酵生産を行なった。11容ジャーファーメンターに入れ酵生産を行なった。11容ジャーファーメンターに入れた表5に示す組成のグルタミン酸生産用培地300mlに各菌株を接種し、培養温度31.5℃でアンモニアガスにてpHを6.5に調整しつつ通気攪拌培養を行なった。初発に加えられたシュクロースを消費し尽くした後は、培養液中のシュクロース濃度が1~3 g/dlの範囲にコントロールされるように別に殺菌した60g/dlのシュクロースと8 g/dlの硫酸アンモニウムの混合溶液を連続的にフィード/フィード液150mlを消費し終わるまで培養を行なつし、フィード液150mlを消費し終わるまで培養を行なつた。培養時間とL-グルタミン酸蓄積量を表6に示す。培養時間とL-グルタミン酸蓄積量を表6に示す。シュクラーゼ遺伝子を導入した株では、シュクロースからのL-グルタミン酸の発酵生産速度が大幅に向上了。

【0042】

【表5】

成 分	組 成
シュクロース	100 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/l
大豆蛋白酸加水分解物	50 ml/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
サイアミン・HCl	350 μg/l
ビオチン	3.5 μg/l

【0043】

【表6】

菌 株	培養時間 (hr)	L-グルタミン酸蓄積 (g/dl)
ATCC13869	45	10.7
ATCC13869/pSSM30	29	10.9

【0044】実施例5 (シュクラーゼ遺伝子断片の縮小化)

pSSM30中のシュクロース代謝速度向上に必須な領域を特定するため、挿入DNA断片の縮小化を行なった。遺伝子配列よりシュクラーゼ遺伝子を含むと予想される配列表の2157塩基目より存在するSacIIサイトより3724塩基目より存在するBanIサイトまでの領域を含む1.5kbのDNA断片をpSSM30より抽出し、両端を平滑末端化した後、エシエリヒア・コリ用ベクターpHSG399のSmaIサイトに挿入した。更に、プレビバクテリウム中で複製可能なプラスミドとするため、プレビバクテリウムのプラスミドの複製起点の導入を行なった。プレビバクテリウムの複製起点を有するプラスミドpHC4 (特開平5-7491号参照)より3 kbの複製起点DNA断片を抽出し、両端の制限酵素部位をリンカーの連結によりBamHIサイトに改変した後、1.5 kbの上記DNA断片が連結されたpHSG399のBamHIサイトに挿入した。作製したプラスミドをpSSM30BSと命名した。

【0045】実施例6 (縮小型シュクラーゼ遺伝子プラスミドのL-リジン生産菌への導入とL-リジン生産への影響)

縮小型シュクラーゼ遺伝子プラスミドpSSM30BSをL-リジン生産菌であるプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11082 (NRRL B-11470)に電気パルス法を用いて導入した。5 μg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて形質転換体を取得し、AJ11082/pSSM30BSと命名した。

【0046】実施例3と同様にして、AJ11082及びAJ11082/pSSM30BSをシュクロースを含む培地にて培養し、L-リジンの発酵生産を行なった。培養時間とL-リジン蓄積量、及び培養終了後の菌体より常法に従って調製した粗酵素液のシュクラーゼ活性を測定した結果を表7に示す。シュクラーゼ遺伝子の導入により、シュクラーゼ

活性が増強され、シュクロースからのL-リジンの発酵  
生産速度が大幅に向上了。

【0047】

【表7】

菌 株	培養時間 (hr)	L-リジン蓄積 (g/dl)	シュ克拉ーゼ活性 (units)
AJ11082	67	9.9	0.39
AJ11082/pSSM30BS	35	9.5	4.10

【0048】実施例7 (縮小型シュクラーゼ遺伝子プラスミドのプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株への導入とL-グルタミン酸生産への影響)

縮小型シュクラーゼ遺伝子プラスミドpSSM30BSをプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869に電気パルス法を用いて導入した。5 μg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて形質転換体を取得し、ATCC13869/pSSM30BSと命名した。

【0049】実施例4と同様にして、ATCC13869及びATCC13869/pSSM30BSをシュクロースを含む培地にて培養し、L-グルタミン酸の発酵生産を行なった。培養時間とL-グルタミン酸蓄積量を表8に示す。シュクラーゼ遺伝子の導入により、シュクロースからのL-グルタミン酸の発酵生産速度が大幅に向上了。

【0050】

【表8】

菌 株	培養時間 (hr)	L-グルタミン酸蓄積 (g/dl)
ATCC13869	43	10.2
ATCC13869/pSSM30BS	30	10.3

【0051】

【発明の効果】コリネホルム細菌に由来し、シュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターを連結して得られる組換えDNAを、L-アミノ酸又は核酸生産能を有するコリネホルム細菌に導入し、該細菌を

配列

AGTCCGTCGA CGCCACCAATT GATGTGGTGG TCA  
CCGAGCT TGCAGGAGGCT TTCTACATCT 60  
ACGCTCCGT CGGCAGTGGAG TGGGGTCATT ACG  
GGTGGGA TCACGCCGGT GAAAGTTGCG 120  
GAACCCATGG TGTTCCCTTGT GGGTTGAGGG AAC  
GAGTGCAG GGTGAGAAGT TTTTCAAGTG 180  
TCTGCAGTT TTAAGTTATG CATCATCAGC TTG  
GAAGGCT GAGGTAATTC AGTAGACCTG 240  
CAACAGCAGG CCTCAAGTCC GAAGATAATT AAC  
CTAGATC CGTAGACATA AGACATCATA 300  
CGTCCTATGC TTGCTGGAAG GAACCAAATA ACC  
TCAGAAA GATGGCAGAA GTGGTGCATT 360  
ATCAAGAAAA TGCAGGTCAA GCAGTTAAAA AAA  
TTGAGGG AAGAATTGTT CCCCCCCTCG 420  
GGGTGATTGA TGGCTTCTC CAACTCGAAA ACG

シュクロースを含む液体培地に培養する本発明の方法によれば、シュクロースから短時間に効率的にL-アミノ酸又は核酸を製造することができる。

【0052】

【配列】

配列番号：1

配列の長さ：6911

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム

株名：ATCC13869

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：342..1505

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：2338..3609

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：4438..5358

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：5570..6577

特徴を決定した方法：P

GCATCAT CACGGAACTC TCTGGAGAAC 480  
CAGCACCTAA AAACGCAGGA TTCCACCCCG AAC  
TCCCCAC GATTGTTCCC GGTTTTATTG 540  
ATCTTCATAA TCACGGTGGGA AACGGTGGCG CGT  
TTCCTAC GGGAACGCAG GACCAGGCGA 600  
GGAACACCCGC GCAGTATCAC CGCGAACATG GCA  
CGACCGT GATGTTGCCA AGCATGGTTT 660  
CGGCGCCGGC TGACGCAC TGACGCAGG TGG  
AAAACCT TATTCCCTTG TGTGAAGAGG 720  
TCCTGCTGTG CGGCATTACAC CTCGAGGGCC CTT  
TCATCAA CGCATGCCGT TGTGGTGCTC 780  
AAAACCCGGA TTTCATTTT CCCGGCAACC CAA  
CAGATCT TGCCCGGGTG ATCCATGCAGG 840  
GAAAAGGTTG GATCAAATCG ATCACAGTAG CGC  
CGGAAAC TGACAATCTT TCTGAGCTTC 900  
TCGATCTCTG CGCAGCGCAC CACATCATTG CTT  
CCTTCGG GCACACTGAT GCAGATTGG 960  
ATACCACTAC CAGCGCAATT GCCTTGGCTA AAG  
AGAAAAAA TGTGACGGTC ACGGCTACGC 1020  
ATTGTTCAA TGCATGCCT CCGCTGCATC ATA  
GGGCTCC CGGCAGCGTG GGGCCTTGC 1080  
TTGCTGCCGC ACGTGCCGGG GACGCATATG TTG  
AGTTGAT CGCCGACGGC GTGCATTGG 1140  
CCGATGGAAC GGTGATCTA GCTCGTTCCA ACA  
ACGCCTT TTTCATCACG GACGCCATGG 1200  
AAGCCGCCGG AATGCCAGAC GGTGAGTACA TTT  
TGGCGT TTTGAACGTC ACCGTCACCG 1260  
ATGGAGTCGC CCGTCTGCAC GATGGCGGCG CCA  
TCGCCGG GGGCACCAAGC ACACTAGCGA 1320  
GTCAGTTCGT GCACCACGTG CGCAGGGGTA TGA  
CGCTTAT CGACGCACCC CTCCACACCT 1380  
CAACCGTCGC CGCTAAAATT CTCGGTCTTG GCG  
ATCACGA AATCGCTAAA TCCAACCCCTG 1440  
CAAATTGT GGTCTTGAC TCAAACGGCC AGG  
TGCAAAA GGTCCATTAA GGTGATCAAG 1500  
TACTTTAAGT ACGAGTAAAA CTATCCTGAT TTT  
AAAGGAG TCCCACCATG GAAATCACTA 1560  
TCTGCAAAGA CGAGCAAGAA GTCGGCAAAG CAG  
TTGCAGT CCTAATCGCA CCCTTCGCCA 1620  
ACAAGGGTGG AACCTTGGGG CTTGCAACAG GAT  
CCTCACC ACTGAGTACC TACCAAGAGC 1680  
TCATTGCGAT GTATGAGCT GGGGAAGTGT CAT  
TCAAGAA CTGCAAGGCA TTCTTGTGG 1740  
ATGAATACGT GGGACTAACCGT GACGATG AAA  
ACAGCTA CTTAAAACC ATTGCAAAG 1800  
AGTTCACTGA CCACATCGAC ATCGTTGATG AAG  
AGGTCTA CAGCCCAGAT GGTGCAAACC 1860  
CTGATCCATA CGAAGCAGCT GCAGAGTATG AGG  
CAAAGAT CGCTGCAGAA TCCGTTGAAG 1920  
TTCAAAATCCT TGGCATCGGC GGAAACGGCA CAT

CGCTTTC ATTGAACCAT CATCTTCTCT 1980  
GTCAGGACTG ACAAAAGGTCC AGGCCTGCA CCC  
TAAAACG GTGGAGGACA ACGCTCGATT 2040  
CTTCAACACC ATCGAAGAGG TCCCAACCCA CGC  
CGTCACC CAGGGTTGG GCACCTTGTC 2100  
CCGCGCGCAA AACATCGTGT TGGTGGCAAC TGG  
TGAAGGA AAAGCCGACG CCATCCGCGG 2160  
AACTGTGGAA GGCCCAGTGA CTGCTTCTTG CCC  
AGGTTCC ATCCGTAGA TGCACAAACAT 2220  
GCCACCATCA TCGTTGGATG AAGCAGCAGT ATC  
CAAGCTG GAAAACGCTG ATCACTACCG 2280  
TCTCATGGAG CAATTAAAGC TGCCTAGAA ACA  
AAAAGGA AAGTACTGTG TGGGGCTATG 2340  
CACACAGAAC TTTCCAGTT GCGCCCTGCG TAC  
CATGTGA CTCCTCCGCA GGGCAGGCTC 2400  
AATGATCCC ACGGAATGTA CGTCGATGGA GAT  
ACCCTCC ACGTCTACTA CCAGCACGAT 2460  
CCAGGTTTCC CCTTCGCACC AAAGCGCACC GGC  
TGGGCTC ACACCAACAC GCCGTTGACC 2520  
GGACCGCAGC GATTGCAGTG GACGCACCTG CCC  
GACGCTC TTTACCCGGA TGCATCCTAT 2580  
GACCTGGATG GATGCTATTG CGGTGGAGCC GTA  
TTTACTG ACGGCACACT TAAACTTTTC 2640  
TACACCGGCA ACCTAAAAAT TGACGGAAAG CGC  
CGCGCCA CCCAAAACCT TGTGAAAGTC 2700  
GAGGACCCAA CTGGGCTGAT GGGCGGCATT CAT  
CGCCGTT CGCCTAAAAA TCCGCTTATC 2760  
GACGGACCCG CCAGCGGTTT CACACCCCAT TAC  
CGCGATC CCATGATCAG CCCTGATGGT 2820  
GATGGTTGGA ACATGGTTCT TGGGGCCCAA CGC  
GAAAACC TCACCGGTGC AGCGGTTCTA 2880  
TACCGCTCGA CAGATCTTGA AAACCTGGAA TTC  
TCCGGTG AAATCACCTT TGACCTCAGT 2940  
GATGCACAAC CTGGTTCTGC TCCTGATCTC GTT  
CCCGATG GCTACATGTG GGAATGCC 3000  
AACCTTTTA CGCTTCGCGA TGAAGAAAAT GGC  
GAAGATC TCGACGTGCT GATTTCTGT 3060  
CCACAAGGAT TGGACCGAAT CCACGATGAG GTT  
ACTCACT ACGCAAGCTC TGACCAAGTGC 3120  
GGATATGTCG TCGACAAGCT TGAAGGAAACG ACC  
TTCCGCG TCTTGCAGG ATTCAAGCGAG 3180  
CTGGATTTCG GCCATGAATT CTACGCACCG CAG  
GTTGCAG TAAACGGTTC TGATGCCTGG 3240  
CTCGTGGGCT GGATGGGGCT GCCCGCGCAG GAT  
GATCACC CAACAGTTGC ACAGGAAGGA 3300  
TGGGTGCACT GCCTGACTGT GCCCCGCAAG CTT  
CATTTGC GCAACCACGC GATCTACCAA 3360  
GAGCTCCTTC TCCCAGAGGG GGAGTCGGGG GTA  
ATCAGAT CTGTATTAGG TTCTGAACCT 3420  
GTCCGAGTAG ACATCCGAGG CAATATTCC CTC

GAGTGGG ATGGTGTCCG TTTGTCTGTG 3480  
GATCGTGATG GTGATCGTCG CGTAGCTGAG GTA  
AAACCTG GCGAATTAGT GATCGCGGAC 3540  
GATAATACAG CCATTGAGAT AACTGCAGGT GAT  
GGACAGG TTTCATTCGC TTTTCCGGC 3600  
CTTCAAAGGT GACACTATTG AGAGATAAGT CAT  
ATAAAAG GGTCTTTGT GGCGAATTGT 3660  
ACAAATACCT CGCAAAATCC CTTGATCTAG TTA  
TTGTCAC TGATGACAAC CCTCGTTAG 3720  
AGGTGCCTGC CACGATTAGC GCAGCAGTCA CTG  
CAGGAGC ACAGCAGGGT GCTTCAGAGT 3780  
CCGAACGACC GGTGGAAGTC CTAGAAATTG GTG  
ACCGTGC AGAAGCAATT CGCGTTTGG 3840  
TCGAGTGGC ACAGCCTGGA GATGGCATTG TAG  
TAGCTGG AAAAGGCCAT GAAGTTGGAC 3900  
AACTAGTTGC TGGTGTCAAC CACCATTG ATG  
ACCGCGA AGAAGTTCCG GCTGCTTGA 3960  
CAGAAAAGCT CAACAAATAAA CTTCCCCTTA CTA  
CGGAAGA AGGATAGGCC ACAGTCATGA 4020  
TCACAATGAC CCTTGGGAA ATCGCTGACA TCG  
TTGGAGG CAGGCTTACT GGCGGTGCTC 4080  
AAGAAGATAC GCTTGTGAGC TCCAGCGTGG AAT  
TTGATTC TCGATCCCTC ACACCGGGTG 4140  
GCTTGTGTTT AGCACTTCCG GGTGCTCGT TAG  
ACGGGCA TGATTTGCT GCAACTGCAA 4200  
TTGAGAAAGG TGCGGTGCA GTATTGGCAG CCC  
GTGAGGTT TGACGTACCT GCGATCGTCG 4260  
TGCCTCCAGT AAAAATCCAG GAATCCAATG CTG  
ACATTAA TGCTCATGAT CCAGATGGC 4320  
ATGGCGCGGC GGTAGTGGAG GCGTTGGTCT CGG  
TTGGCTC GCCACGTGGT GGATATCTGC 4380  
GTGGATGGCC ATCAATTGAA CGTTGTGGCT ATT  
ACTGGTT CTGTGGAAA GACTTCTATG 4440  
AAGGATTTCA TCGCGACGGT TCTTGGCCAA GAT  
GGGCCAA CTGTGGCTCC TCCGGGCTCG 4500  
TTTAACAATG AGCTTGGTTT GCCACACACC GCG  
CTCCGCT GCACAACCGA TACTAAGTAT 4560  
TTGGTGGCTG AGATGTCCGC GCGTGGCATT GGA  
CATATTA AGCACCTGAC AGAGATTGCT 4620  
CCGCCACCGA TTGCAGCTGT GCTCAACGTC GGC  
CATGCGC ACCTGGGTGA ATTTGGATCC 4680  
CGCGAGAATA TCGCGCAGGC AAAAGGGCAG ATC  
ATTGAAG CGCTGCCCTC GAAGAAAACG 4740  
GGTGGGGTAG CAGTCCTTAA CGCTGACGAT CCT  
TTTGTGCG CCCGGATGGC TCCACCGACT 4800  
AAGGCGCGCG TGTTGTGGTT TACCAACCGAT GCA  
GGTCAAG CAAAAAAAGTC TGATTATTGG 4860  
GCAACGAGTA TTTCACTGGA CGCTGTTGCG CGG  
GCAAGCT TTACGCTGAA CACGAAGGAC 4920  
GGGTCTTGGC CGGTGCCCT GCAGGTTTT GGT

GAGCACC AGGTTGCTAA TGCAC TTGCT 4980  
GCTGCTGCCA TTGCCATGGA AGCTGGCGTC GCC  
CCAGAAC TGGTGGTTGC TGGATTGGAA 5040  
GCACATTCAAG CGGCTTCCGC GCACCGCATG GAT  
GTAAAGA CCCGCGCCGA CGGCCTGAC 5100  
ATCATCAACG ATTCTTACAA CGCGAATCCT GAT  
TCTATGC GTGCAGGTAT CGCGGCTCTT 5160  
GCGTACACAG CTAGTGGTCG TTCTCTGAAG CAA  
CAAGCTG GGCAGTGCTT GGTCAAATGG 5220  
GTGAGCTTGG CGATGACGCC TCGGAAGCCC ATG  
CCGAAC TGGTGCTGAG CTGCCTAAAT 5280  
ACAATGTTCA AGAACTTGTC GCAGTGGGGG AGA  
ACCCTAC CTGTGCAGCA CTTGCAGAGT 5340  
CCGCAGCGAG CCTGGGTGTG AGTACTCACG TAG  
TTTCAGA CGTTGATGCA GCGCTCGAGT 5400  
TGCTCGCAGC CCATATTAAG CGGGATGATG TAG  
TGCTGGT TAAGGCTTCA AATGCTGATC 5460  
GCCTGTGGAG GGTCGCAGAA GCACTACATG GCA  
TGGTGCC GGCCTCAAAA ACACAGGTGG 5520  
CTCGGTCAAC GACGATTCTC GTCGGAACGT GGA  
AGGACAG TAGAAAACAA TGCAACAGAT 5580  
TATGGTCAGT GGAACGGTTG CGTTCCCTCGT CTC  
AATCTTT CTCACCCCCGG TGTTGATCCG 5640  
TTATTCACT AACCGCCAGT TGGGCCAGGA AAT  
CCGTGAA GAAGGCCTGC AGTCTCACTT 5700  
GCGTAAGCGT GGCACTCCAA CCATGGGTGG CAT  
TGC GATT ATCGCGGGCA TTGTTGTGGC 5760  
CTATGTGTTT ACCAATATCT TGGCCATGAT CCA  
AGGCGTT GGTGGATTCA CAGTCTCCGG 5820  
CTTGCTCGTG TTGGGTCTGA CCTTGGGCCT TGG  
TGCCACT GGCTTCGCCG ATGACTTCAT 5880  
CAAGCTGTAC ATGAACCGAA ACCTTGGTTT GAA  
CAAGACC GCTAAGCTGG TGTCTCAGCT 5940  
GGCCATTGCG TTGATCTTG GTTTTTGGT ACT  
GCAGTTT CCCGATGAAA ACGGTCTGAC 6000  
CCCAGCATCA ACCCACCTGT CATTCAATTG CGA  
TATCGAC ACCATTGACC TTGGCTTCGG 6060  
GGACAGCGTT TTTGGCATCA TCGTGTTCCT CAT  
TTTTATC TACGTTGTGG TCAGCGCGTG 6120  
GTCGAATGCC GTGAACATCA CTGATGGTTT GGA  
TGGTTTG GCTGCAGGTA CCACAGCATT 6180  
TGTCA TGGGT GCTTACACCT TGATCACGTT CTG  
GCAGTTT CGAAACTCCT GCGATACTGC 6240  
AGTGGAAAGCG GGTTGCAATA CGGTGCGTG TCC  
ACTGGAT TTGTCTGTGT TGTGCGCTGC 6300  
TGGTCTGGCG CCACCTTGGG CTTTCTGTGG TGG  
AATGCGG CACCGACAAA GATCTTCATG 6360  
GGCGATACTG GTTCTTGGC ACTGGGCGGT TTG  
GTTGCAG GTATTCTGT GGTTAGCCGC 6420  
ACCGAGCTGC TCATGGTTAT CATCGGGCGCG CTG

TTTGTCA TTGAGGTCGC TTCTGTTGCG 6480  
 ATCCAGATCG GCGTGTAA GACCCGCGGT AAG  
 CGTGTGT TCAAAATGGC TCCGATCCAC 6540  
 CACCACTTCG AGGCCCTGG GTGGACTGAA ACT  
 ACCGTGA CCATCCGTT CTGGCTGATC 6600  
 ACGATCATGA CTGTGTTGGC GGGTGTGCG 6660  
 TTTAACCA GCGACTGGCT CCACTTAGCG 6720  
 TTACCTC AGGCGCTGCA GGGCCGTATT 6780  
 CTTGTGGCCG GCGCTGGTGT TTCCGGCCTG TCC  
 ATAGCAA AGATGCTCAG TGAGTTGCAT 6840  
 TGCGATGTTG TGGTCACCGA CGAGAACGAA ACT  
 GCACGTC ACATGCTCAT TGAAGTAGTA 6900  
 GACGTTGCAG ATATCAGCAC CGCCCAGGCT CAG  
 GAACAGC TGGATTCTTT CTCCATTGTG 6900  
 GTCACCTCCC C

トボロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

【0053】配列番号：2

配列の長さ：424

配列の型：アミノ酸

配列

Met	His	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg
Pro	Ala	Tyr	His	Val	Thr	Pro		
1					5			
10						15		
Pro	Gln	Gly	Arg	Leu	Asn	Asp	Pro	Asn
Gly	Met	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp		
				20			25	
					30			
Thr	Leu	His	Val	Tyr	Tyr	Gln	His	Asp
Pro	Gly	Phe	Pro	Phe	Ala	Pro		
				35			40	
					45			
Lys	Arg	Thr	Gly	Trp	Ala	His	Thr	Thr
Thr	Pro	Leu	Thr	Gly	Pro	Gln		
				50			55	
					60			
Arg	Leu	Gln	Trp	Thr	His	Leu	Pro	Asp
Ala	Leu	Tyr	Pro	Asp	Ala	Ser		
				65		70		
					75		80	
Tyr	Asp	Leu	Asp	Gly	Cys	Tyr	Ser	Gly
Gly	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Gly		
				85				
					90		95	
Thr	Leu	Lys	Leu	Phe	Tyr	Thr	Gly	Asn
Leu	Lys	Ile	Asp	Gly	Lys	Arg		
				100			105	
					110			
Arg	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Val	Glu	Val
Glu	Asp	Pro	Thr	Gly	Leu	Met		

105	110
115	
Gly Gly Ile His Arg Arg Ser Pro Lys	
Asn Pro Leu Ile Asp Gly Pro	
120	125
130	
Ala Ser Gly Phe Thr Pro His Tyr Arg	
Asp Pro Met Ile Ser Pro Asp	
135	140
145	160
Gly Asp Gly Trp Asn Met Val Leu Gly	
Ala Gin Arg Glu Asn Leu Thr	
165	
170	175
Gly Ala Ala Val Leu Tyr Arg Ser Thr	
Asp Leu Glu Asn Trp Glu Phe	
180	185
190	
Ser Gly Glu Ile Thr Phe Asp Leu Ser	
Asp Ala Gin Pro Gly Ser Ala	
195	200
205	
Pro Asp Leu Val Pro Asp Gly Tyr Met	
Trp Glu Cys Pro Asn Leu Phe	
210	215
220	
Thr Leu Arg Asp Glu Glu Thr Gly Glu	
Asp Leu Asp Val Leu Ile Phe	
225	230
235	240
Cys Pro Gin Gly Leu Asp Arg Ile His	
Asp Glu Val Thr His Tyr Ala	
245	
250	255
Ser Ser Asp Gin Cys Gly Tyr Val Val	
Asp Lys Leu Glu Gly Thr Thr	
260	265
270	
Phe Arg Val Leu Arg Gly Phe Ser Glu	
Leu Asp Phe Gly His Glu Phe	
275	280
285	
Tyr Ala Pro Gin Val Ala Val Asn Gly	
Ser Asp Ala Trp Leu Val Gly	
290	295
300	
Trp Met Gly Leu Pro Ala Gin Asp Asp	
His Pro Thr Val Ala Gin Glu	
305	310
315	320

Gly Trp Val His Cys Leu Thr Val Pro  
 Arg Lys Leu His Leu Arg Asn  
 325

His Ala Ile Tyr Gin Glu Leu Leu Leu  
 Pro Glu Gly Glu Ser Gly Val  
 345

350

Ile Arg Ser Val Leu Gly Ser Glu Pro  
 Val Arg Val Asp Ile Arg Gly  
 360

Asn Ile Ser Leu Glu Trp Asp Gly Val  
 Arg Leu Ser Val Asp Arg Asp  
 375

380

Gly Asp Arg Arg Val Ala Glu Val Lys  
 Pro Gly Glu Leu Val Ile Ala  
 390

395

Asp Asp Asn Thr Ala Ile Glu Ile Thr  
 Ala Gly Asp Gly Gin Val Ser  
 405

410

Phe Ala Phe Pro Gly Leu Gln Arg  
 420

## フロントページの続き

			技術表示箇所
(51) Int. Cl. 6	識別記号	府内整理番号	F I
(C 1 2 N 1/21 C 1 2 R 1:15)			
(72) 発明者 土屋 誠 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内	(72) 発明者 吉原 康彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社生産技術研究所内		
(72) 発明者 松井 裕 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内	(72) 発明者 中松 亘 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社生産技術研究所内		